

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-209870

(43)公開日 平成5年(1993)8月20日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 30/88	F	8506-2 J		
C 0 7 D 213/66				
G 0 1 N 30/14	A	8506-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数3(全 7 頁)

(21)出願番号 特願平4-16071

(22)出願日 平成4年(1992)1月31日

(71)出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72)発明者 吉村 義信

大阪府茨木市美穂ヶ丘19番C-601号

(72)発明者 大西 功二

兵庫県西宮市両度町5番1-402号

(72)発明者 ▲廣▼瀬 美砂子

兵庫県神戸市西区富士見ヶ丘4丁目7番2号

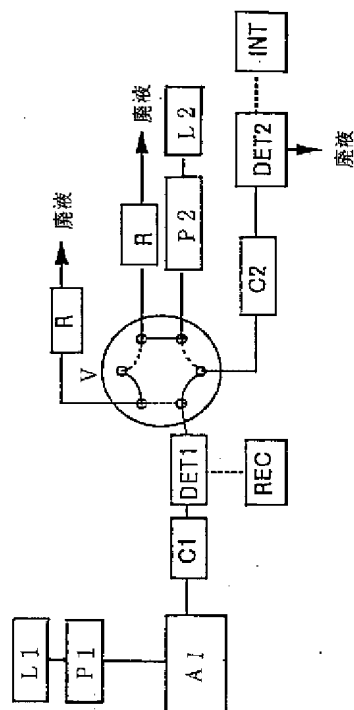
(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

(54)【発明の名称】 ピリジノリン類の自動定量方法およびその定量装置

(57)【要約】

【目的】 ピリジノリン類を尿や生体組織試料中の他の成分から分離する前処理が、人手を介することなく、短時間で精度よく定量的に行えるピリジノリン類の高精度自動定量方法および装置を提供する。

【構成】 分析カラムとモードの異なる前処理カラムを用いて試料中のピリジノリン類含有画分を分離し、カラム・スイッチングにより、その画分を分析カラムに注入することからなるHPLCによるピリジノリン類の自動定量方法およびその装置。

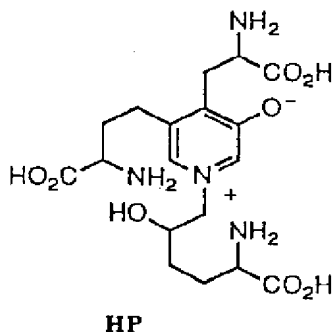


【特許請求の範囲】

【請求項1】 ピリジノリン類含有試料を、分析カラムとモードの異なる前処理カラムに通し、該前処理カラムにおけるピリジノリン類含有画分のリテンション・タイムに応じたカラム・スイッチングにより該画分を分析カラムに導入し、高速液体クロマトグラフィーに付すことを特徴とするピリジノリン類の自動定量方法。

【請求項2】 前処理カラムがゲル浸透カラムである請求項1記載の方法。

【請求項3】 ピリジノリン類含有試料前処理用の、分析カラムとモードの異なる高速液体クロマトグラフィー用の前処理カラムと、前処理カラムの溶出液の流路を切り替える切替バルブと、該バルブに連結された高速液体クロマトグラフィー用の分析カラムと、該分析カラムからの溶出液を検知する検出器と、各カラムへの移動相供給手段と、切替バルブを作動する作動手段とからなるこ*



【0004】で表されるアミノ酸で、骨の吸収に伴うコラーゲンの破壊により尿中に排泄される。尿中にはピリジノリン類は遊離型およびペプチドや糖類との結合理型として存在することが知られている。骨粗鬆症、慢性リウマチ関節炎、ペジエット病、糖尿病、甲状腺機能亢進症、骨腫瘍、癌の骨転移や、閉経や卵巣摘出などによる骨疾患による骨組織を形成するコラーゲンが破壊され、ピリジノリン類が高濃度に尿中に排泄されるため、ピリジノリン類の分析や測定が、これらの病態判定や、またそれらの疾患の薬物治療における薬効評価の新しい生化学的指標として注目を浴びるようになってきている。

【0005】尿をはじめとする生体組織試料中のピリジノリン類の分析方法は、高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLCと略す）が汎用されている。この方法は、エイアーら〔(Eyre, et al.)、アナリティカル バイオケミストリー (Anal. Biochem.)、137巻380頁、1984年〕によって報告された方法で、逆相系のオクタデシルシリル化されたシリカゲル（以下、ODSと略す）を充填したカラムを用い、移動相としてn-ヘプタフルオロ酪酸（以下、HFBAと略す）を含む溶媒で、蛍光検出器によりHPおよびLPをそれぞれ分離、検知する方法である。ODS系カラム以外にイオン交換樹脂カラムなどを用いる方法もあるが、どのような※50

*とを特徴とするピリジノリン類の自動定量装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

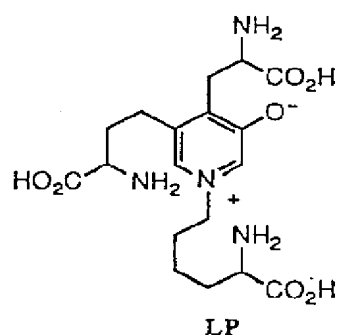
【産業上の利用分野】本発明はピリジノリン類の自動定量方法およびその定量装置に関する。さらに詳しくは、本発明は尿中、骨などの生体組織中のピリジノリン類を、前処理を含め、高速液体クロマトグラフィーにより全自動で定量する方法およびその装置に関する。

【0002】

【従来の技術】ピリジノリン類、すなわち、ヒドロキシリジルピリジノリン（以下、HPと略す）およびリジルピリジノリン（以下、LPと略す）は、骨コラーゲンの分子間架橋を司る式：

【0003】

【化1】



※カラムを用いてHPLC分析を行うとしても、HPLCに試料を注入する前には、生体組織試料の前処理を行っている。

【0006】前記のエイアーらは、生体組織試料中の全ピリジノリン類（HP、LPそれぞれの遊離型および結合理型の合計）の濃度の測定のために塩酸処理した試料を減圧下に乾燥し分析に供するか、骨では塩酸処理した試料をバイオゲル P-2カラムクロマトグラフィーを用いてピリジノリン類を10%酢酸で溶出させ、目的画分を凍結乾燥後分析に供している。ブラックら (Black et al.) は、尿中の全ピリジノリンの測定において、尿と同容量の濃塩酸とを107℃で18時間加熱し、加水分解した試料をCF1セルロースを用いたカラムに吸着させ、1-ブタノール/水/酢酸の混液で洗浄後、水でピリジノリン画分を溶出させ、水層部を凍結乾燥し、溶媒で再溶解することにより、HPLC試料を調製する方法を報告している〔アナリティカル バイオケミストリー (Anal. Biochem.)、169巻197頁、1988年〕。さらに、尿中の遊離型のピリジノリンを測定する場合には、加水分解操作が不要のため、尿をそのままCF1セルロースで前記した方法で前処理をしている〔ブラックら、カルシファイド ティッシュ インターナショナル (Black et al., Calcif. Tissue Int.)、

44巻、343頁、1989年]。現在、ビリジノリン類の定量は、一般に、ブラックらの方法に従って試料の前処理を行い、エイアーらのHPLC分析法に準拠して行われている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、ブラックらの前処理法は、測定者がCF1セルロースを手でカラムに充填し、尿または生体組織試料をそのまま、もしくは塩酸処理した後、CF-1カラムにチャージして、前記の溶媒で洗浄し、水でビリジノリン類含有画分を溶出させ、濃縮乾固後、HPLCの分析試料としている。この場合、CF1セルロースの充填の仕方や試料調製の仕方、溶媒のバランスなどによりビリジノリン類の溶出が変化し、さらに内部標準もないためビリジノリンの回収率が不確かとなる。さらに、溶離液を凍結乾燥や濃縮乾固するため、多大の時間を要し、その間のビリジノリン類の安定性に影響を及ぼすなど、測定の精度を大幅に落とす要因がある。事実、ブラックらは、尿を加水分解し、前処理して分析した場合の変動係数は12~16%と報告しており、分析精度的に劣る。

【0008】また、臨床検査において多量の試料を測定するには、カラム充填、カラム処理、溶媒留去、HPLCへの試料注入といった操作に人手や時間を要するなど経済的な損失も大きい。例えば、前処理のCF1セルロースカラムの調製、溶媒留去到1日以上もの多大の時間を要するなどの問題がある。本発明の目的は、これらの問題点を解消するために、ビリジノリン類を試料中の他の生体成分から分離する前処理に際し、人手を介することなく、定量的に行え、かつ自動的に分析カラム注入し、分析できるビリジノリンの自動定量方法およびその装置を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、分析カラムと、その分析カラムとはモードの異なるHPLC用カラムを前処理カラムとして組み合わせて用い、前処理カラムでビリジノリン類と他の生体成分とを分離させ、ビリジノリン類含有画分をカラム・スイッチングにより分析カラムに注入することにより、遊離型、結合型を問わず、前処理を含む全分析工程をHPLCにより全自動でビリジノリン類、すなわち、HPおよび/またはLPの定量ができることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0010】すなわち、本発明は、その一つの態様において、ビリジノリン類含有試料を、分析カラムとモードの異なる前処理カラムに通し、該前処理カラムにおけるビリジノリン類含有画分のリテンション・タイムに応じたカラム・スイッチングにより該画分を分析カラムに導入し、高速液体クロマトグラフィーに付すことを特徴とするビリジノリン類の自動定量方法を提供するものであ

る。

【0011】また、本発明はもう一つの態様において、ビリジノリン類含有試料前処理用の、分析カラムとモードの異なる高速液体クロマトグラフィー用の前処理カラムと、前処理カラムの溶出液の流路を切り替える切替バルブと、該バルブに連結された高速液体クロマトグラフィー用の分析カラムと、該分析カラムからの溶出液を検知する検出器と、各カラムへの移動相供給手段と、切替バルブを作動する作動手段とからなることを特徴とするビリジノリン類の自動定量装置を提供するものである。

【0012】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の定量方法においては、まず、ビリジノリン類含有試料を前処理カラムによるHPLCに付して、HPおよびLPを含有するビリジノリン類含有画分を試料中の他の成分と分離する。対象とする試料は特に限定するものではなく、本発明の方法は、尿をはじめ、骨、歯、腱、関節液、血液などのような生体組織由来の試料に適用でき、そのまま直接あるいは、必要に応じて、常法により除蛋白や加水分解して、遊離型、結合型、あるいは両方のHPおよび/またはLPの定量を行える。

【0013】用いる前処理カラムは、後に用いる分析カラムとモードの異なる、例えば、ビリジノリン類を分子篩的に分離できるHPLC用カラムとする。すなわち、この前処理では、試料中の夾雑物とビリジノリン類を分離し、分析カラムでの検出力を上げることが必要である。そのためには、前処理でビリジノリン類が試料の他成分と可能な限りに分離し、ピーク幅が広がらず、不要な画分を分析カラムに送り込まないことが肝要となる。前処理カラムとして、分析カラムと同じモードのカラムを用いた場合、夾雑物によるピークとの大幅な分離の向上は期待できない。そこで、本発明においては、分子量の違いに着目し、分離モードの異なる、例えば、分子篩的な分離カラム、好ましくは、ゲル浸透カラム（以下、GPCと略す）、さらに好ましくは、ポーラスポリマー系またはシリカ系充填剤、特にポーラスポリマー充填剤を充填したGPCカラムを選択する。分析カラム内でのビリジノリン類の保持を高めるため、陰イオン対試薬、例えば、アルキルスルホン酸類やフッ素で置換した脂肪酸類などをイオンペアーとして用いる。通常、前処理カラムの移動相としてはHFBA水溶液が用いられ、試料量、カラムのサイズ、移動相の流速等は試料の種類等に応じて適宜選択する。

【0014】前処理カラムよりの溶出液は、通常、ビリジノリン類は紫外検出器により297nmで検知できる。本発明の定量方法においては、前処理カラムより溶出してくるビリジノリン類含有画分を分析カラムに注入するため、前処理カラムにおけるビリジノリン類含有画分のリテンション・タイムに応じたカラム・スイッチング法を採用する。すなわち、前処理カラムと分析カラムの間に、流路切替バルブ、例えば、タイマー式信号発生

手段などにより制御された流路切替バルブ、例えば、6方バルブを設け、ピリジノリン類含有画分のみが分析カラムに注入されるよう接続時間を調節、設定する。例えば、信号により流路を切り替え、前処理カラムよりピリジノリン類含有画分の溶出している時間だけ分析カラムと接続するようにし、それ以外の時間は廃液側に流れるようにする。この方法によりピリジノリンの分離能が高まるとともに分析カラムの汚染による劣化も防げる。

【0015】本発明の定量方法における分析カラムおよびそれを用いるHPおよび／またはLPの定量は、前記エイアーらの方法のような、自体公知の方法で行うことができる。本発明の方法は分離精度が非常に高いので、公知の定量方法に使用するHPおよびLPの標品として、本発明の方法を用いて尿等より単離したHP、LPを用いることもできる。

【0016】さらに、一定量の試料を一定間隔で注入できるオートインジェクターを併用することにより、試料を試料管に入れ、スタート信号を送るだけで、多量の試料も自動的にピリジノリンの定量が可能となる。

【0017】本発明の定量方法は、例えば、本発明のピリジノリン類の自動定量装置を用いて実施することができ、該装置は前記の前処理カラムと、前処理カラムの溶出液の流路を切り替える切替バルブ、例えば、6方バルブと、該バルブに連結された分析カラムと、該分析カラムからの溶出液を検知する検出器、例えば、蛍光検出器と、各カラムへの移動相供給手段、例えば、送液ポンプと、切替バルブを作動する作動手段、例えば、タイマー式信号発生装置とモータの組み合わせとからなる。

【0018】添付の図1に、本発明の自動定量装置の具体例のフロー・チャートを示す。図1において、L1は前処理カラムの移動相、P1は前処理カラム用移動相の送液ポンプ、AIはオートインジェクター、C1は前処理カラムを表す。DET1は紫外検出器、RECはその記録計である。このDET1やRECは前処理カラムからのピリジノリン類の溶出の確認や、前処理カラムの劣化状況を判断するのに用いるが、なくてもよい。Vは流路の切り替えを行う6方バルブで、信号により制御される。L2は分析カラムの移動相、P2は分析カラム用移動相の送液ポンプ、C2は分析カラム、DET2は蛍光検出器、INTはインテグレータ、Rはレリーフバルブである。これら各カラム、バルブ、ポンプ等は、例えば、ステンレス管などからなるラインで連結されている。

【0019】L1にある移動相としては、通常、0.01～0.1モル、好ましくは、0.02～0.05モルのHFBA水溶液が用いられ、P1の送液用ポンプを用いて、通常、0.3～1.5ml/分、好ましくは0.5～1.0ml/分の流速で送液する。C1のカラムとしてはGPCカラムが用いられる。かかるGPCカラムとしては、排除限界分子量40,000以下の、ポーラスポリマー

系もしくはシリカ系充填剤、好ましくは3,000以下のポーラスポリマー系充填剤を充填したものを用いる。通常、内径7.6mm、長さ500～100mm、好ましくは100mmのカラムを用いる。DET1の紫外検出器によりピリジノリン類の吸収波長である297nmでピリジノリン類含有画分を検知する。

【0020】Vは6方バルブで、信号によりGPCカラムの溶出液の流路を切り替え、GPCカラムよりピリジノリン類含有画分の溶出している時間だけ分析カラムと接続するようにし、それ以外の時間は廃液側に流れるようにする。

【0021】C2の分析カラムは、ODSカラムであり、通常、その内径は、4.6～10mm、長さは150～500mm、好ましくは、内径4.6mm、長さ150～250mmである。L2にある移動相としては、10～30%アセトニトリル/0.01～0.1モルHFBA溶液、好ましくは、15～25%アセトニトリル/0.02～0.05モルHFBA溶液を用いられ、P2の送液ポンプを用いて、通常、0.5～1.5ml/分、好ましくは0.8～1.2ml/分の流速で送液する。DET2は蛍光検出器で、励起波長295nm、測定波長395nmにてHPおよびLPをそれぞれ検知する。INTはインテグレータであり、蛍光検出器と連結する。Rのレリーフバルブにより流路切替時の圧力変動を避ける。

【0022】本発明の方法および装置を用いて遊離型のピリジノリンを測定する場合は、尿等の液体試料を直接用いることができ、試料中の不溶物を遠心分離または濾過により除き、遠心上清液またはろ液をオートインジェクターの試料管に入れ、スタート信号を入れるだけで、分析できる。その際の前処理カラムとしては、例えば、内径7.6mm、長さ100mmのGPCカラムを用い、移動相として0.03モルHFBA溶液を流速1.0ml/分で送液する。

【0023】尿中や生体組織中の全ピリジノリン量を測定する場合には、試料が塩酸で加水分解されているため、夾雑物が多く含まれている。それゆえ、前処理での厳密なサイズ排除と分析カラムでの厳密な分離が必要である。塩酸処理した試料を遠心分離し、上清をオートインジェクターの試料管に入れる。前処理カラムとして、例えば、内径7.6mm、長さ100mmのGPCカラムを用い、移動相として0.03モルHFBA溶液を流速0.5ml/分で送液する。分析カラムは、分離能をより高めることが必要なため、理論段数の高いODSカラムで、内径4.6mm、長さ250mmのものを用い、移動相として0.03モルHFBA溶液を流速1.0ml/分で送液する。

【0024】

【実施例】以下に、実施例を示して本発明の定量方法および装置について、さらに詳しく説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例1

HPおよびLPの標品の調製

ラット尿500mlを減圧下、50mlに濃縮し、不溶物を除去した後、母液に酢酸5mlを加える。さらに、不溶物を除去し、母液をバイオゲルP-2カラムクロマトグラフィー（カラム内径2.5cm、長さ90cm）に付し、10%酢酸で溶出する。HP溶出画分（200mlから300mlの間）を減圧下に濃縮し、HFBAを10%になるように加える。この液をODSカラムクロマトグラフィー（カラム内径2cm、長さ25cm、YMC S-5 120A ODS）に付し、0.03モルHFBA/19%アセトニトリルを用いて流速10ml/分で溶出する。11分付近に溶出するHPピークおよび12分付近に溶出するLPピークを集め、濃縮する。この液を、GS-220を充填したカラム（内径7.6mm、長さ1000mm）に通し、水を移動相として流速1ml/分で溶出する。20分付近に溶出するHPおよびLPのピークをそれぞれ集め、凍結乾燥すると標品のHPおよびLPが得られる。

【0025】HPおよびLPの検量線の作成

HPおよびLP標品の0~10μM標準溶液を調製し、各標準溶液を図1の装置のオートインジェクター用試料管に入れる。25μlをオートインジェクターを通じてGPCカラム（排除限界分子量3,000以下、内径7.6mm、長さ100mm、Asahipak GS-220M）に注入する。P1より0.03モルHFBAを流速1.0ml/分で流す。その際、6方バルブは廃液に流れる方向にし*

HPおよびLPのラット尿からの添加回収の結果

添加濃度 nmol/ml	測定値 nmol/ml		回収率 %	
	HP	LP	HP	LP
0	0.28	0.08	—	—
0.8	1.06	0.90	98	102.5
2.0	2.18	2.08	95	100.0

【0028】実施例3

ラット尿中の遊離型HPおよびLPの測定

ラット尿100μlをオートインジェクター用試料管に入れる。25μlを図1の装置のオートインジェクターを通じてGPCカラム（排除限界分子量3,000以下、内径7.6mm、長さ100mm、Asahipak GS-220M）に注入する。L1よりP1を通じ0.03モルHFBA水溶液を流速1.0ml/分で流す。その際6方バルブは廃液に流れる方向にしておき、ビリジノリン類含有画分がGPCカラムより溶出する直前、すなわち注入開始後2.0分にバルブを切り替えて分析カラム側に接続させ、ビリジノリン類含有画分がGPCカラムより溶出の終わった直後、すなわち注入開始後3.2分にバルブを廃液側に切り替える。分析カラムはODSカラム（内径4.6mm、長さ150mm、粒子径5μm、YMC A-3※50

*ておき、ビリジノリン類含有画分がGPCカラムより溶出する直前、すなわち注入開始後2.0分にバルブを切り替えて分析カラム側に接続させ、ビリジノリン類含有画分がGPCカラムより溶出の終わった直後、すなわち注入開始後3.2分にバルブを廃液側に切り替える。分析カラムはODSカラム（内径4.6mm、長さ150mm、粒子径5μm、YMC A-302 S-5 120A ODS）を用い、L2よりP2を通じ19%アセトニトリル/0.03モルHFBA水溶液を流速1.0ml/分で流し、分析カラムより溶出してきたHPおよびLPを蛍光検出器で測定する。このようにして得られた検量線を図2に示す。図2に示すように各標準溶液の濃度とピーク高さの間には良好な直線関係が認められ、相関係数は、いずれも0.999以上である。また、検出限界はS/N比を3とするとHPは0.9pmol、LPは1.1pmolとなる。

【0026】実施例2

ラット尿中からのHPおよびLPの添加回収実験

ラット尿160μlにHPおよびLPの混合標準溶液400μlを加える。この溶液を0.45μmのフィルタで濾過し、実施例1に記載した方法でHPおよびLPの濃度を定量する。回収率を表1に示す。平均回収率は95%である。また、同一の濃度で9回測定した場合の信頼係数は1.5%と良好な再現性を示す。

【0027】

【表1】

※02 S-5 120A ODS)を用い、L2よりP2を通じ、移動相として19%アセトニトリル/0.03モルHFBA水溶液を流速1.0ml/分で流し、溶出してきたHPおよびLPを蛍光検出器で測定する。このときのクロマトグラムを図3に示す。HPの保持時間は17分、LPは19分である。

【0029】実施例4

ラット尿中の全HPおよびLPの測定

ラット尿250μlを同容量の濃塩酸とともにスクリーキャップ付きの試験管に入れ、108℃で18時間加熱する。冷却後、遠心上清液100μlを図1の装置のオートインジェクター用試料管に入れる。25μlをオートインジェクターを通じてGPCカラム（排除限界分子量3,000以下、内径7.6mm、長さ100mm、Asahipak GS-220M）に注入する。L1よりP1を通

じ0.03モルHFBA水溶液を流速0.5ml/分で流す。その際、6方バルブは廃液に流れる方向にしておき、ピリジノリンがGPCカラムより溶出する直前、すなわち注入開始後4.7分にバルブを切り替えて分析カラム側に接続させ、ピリジノリン類含有画分がGPCカラムより溶出の終わった直後、すなわち注入開始後5.8分にバルブを廃液側に切り替える。分析カラムはODSカラム(内径4.6mm、長さ250mm、粒子径5 μ m、YMC A-303 S-5 120A ODS)を用い、L2よりP2を通じ、移動相として19%アセトニ

【0030】実施例5

骨中のHP量の測定

ラット乾燥大腿骨294mgを10mlの6N塩酸と110 \sim 120 $^{\circ}$ Cで18時間加熱する。水酸化ナトリウム水溶液で中和後、減圧下に乾固する。残渣を移動相に溶解し、不溶物を濾去し、実施例2の方法と同様にしてHP

【0031】

【発明の効果】本発明によれば、ピリジノリン類の定量における、試料中の他の成分からピリジノリン類を分離する前処理が、人手を介することなく、定量的に、極めて短時間で精度よく行え、少量の試料量で精度が高く、かつ、前処理を含め、全分析工程を全自動で行えるピリジノリンの高精度自動定量方法および装置が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明のピリジノリン類自動定量装置の具体例のフロー・チャート。

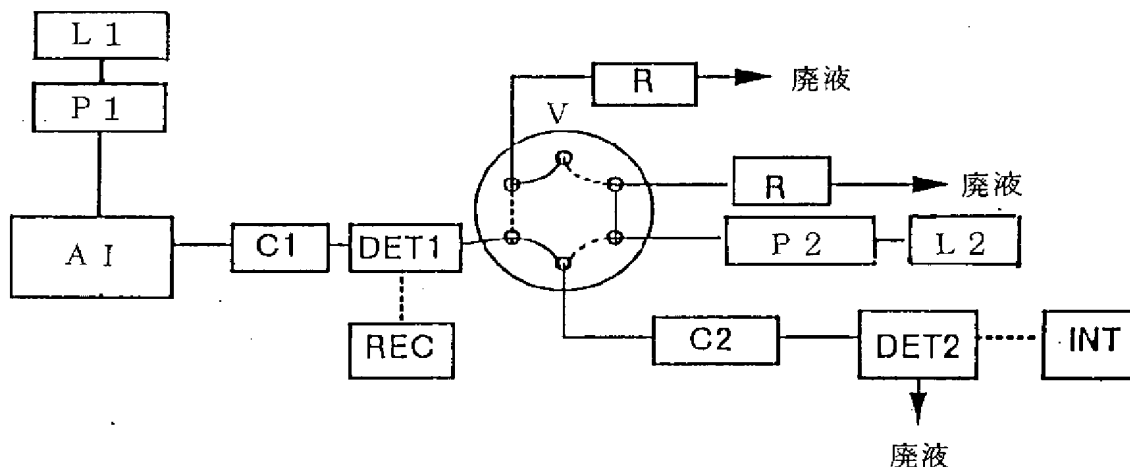
【図2】 HPおよびLPの検量線的具体例。

【図3】 ODSカラムによるHPおよびLP分離のクロマトグラム。

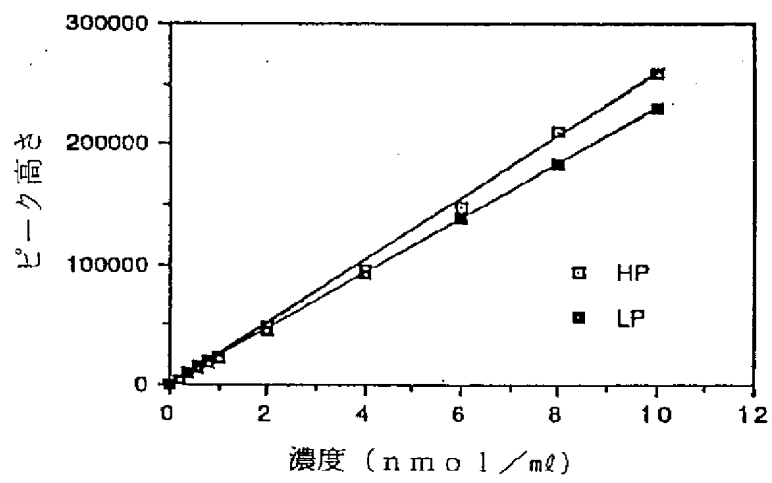
【符号の説明】

L1：前処理カラムの移動相、P1：前処理カラム用移動相の送液ポンプ、AI：オートインジェクター、C1：前処理カラム、DET1：紫外検出器、REC：記録計、V：6方バルブ、L2：分析カラムの移動相、P2：分析カラム用移動相の送液ポンプ、C2：分析カラム、DET2：蛍光検出器、INT：インテグレータ、R：レリーフバルブ

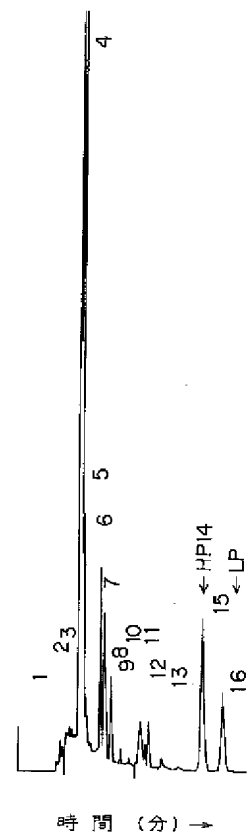
【図1】



【図2】



【図3】



PAT-NO: JP405209870A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 05209870 A
TITLE: METHOD AND APPARATUS FOR AUTOMATICALLY QUANTIFYING
PYRIDINOLINE
PUBN-DATE: August 20, 1993
INVENTOR-INFORMATION: YOSHIMURA, YOSHINOBU; ONISHI, KOJI; HIROSE, MISAKO
ASSIGNEE-INFORMATION: TAKEDA CHEM IND LTD
APPL-NO: JP04016071
APPL-DATE: January 31, 1992
INT-CL (IPC): G01N030/88, C07D213/66 , G01N030/14
US-CL-CURRENT: 422/70

ABSTRACT:

PURPOSE: To obtain a highly accurate method and apparatus for automatically quantifying pyridinoline for performing preparatory treatment for separating pyridinoline from urine or other components in an organic sample accurately in a short time.

CONSTITUTION: A method and apparatus for automatically quantifying pyridinoline by means of an HPLC comprises separating pyridinoline-containing fractions in a sample by using a pre-treatment column having a different mode from an analysis column and injecting the fraction into the analysis column by column switching.

CLAIM + DETAILED DESCRIPTION

[Claim(s)]

[Claim 1] A pyridino phosphoruses inclusion sample in the pretreatment column with which an analysis column differs from a mode Through, The automatic fixed quantity method of the pyridino phosphoruses characterized by introducing this fraction into an analysis column by column switching according to the retention time of the pyridino phosphoruses inclusion fraction in this pretreatment column, and giving high performance chromatography.

[Claim 2] The way according to claim 1 a pretreatment column is a gel osmosis column.

[Claim 3] The pretreatment column for high performance chromatography which differs in the analysis column and mode for pyridino phosphoruses inclusion sample pretreatment, The change bulb which changes the pass of the eluate of a pretreatment column, and the analysis column for high performance chromatography connected with this bulb, Automatic fixed quantity equipment of the pyridino phosphoruses characterized by consisting of the detecting element which detects the eluate from this analysis column, a mobile phase supply means to each column, and an operation means to operate a change bulb.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the automatic fixed quantity method of pyridino phosphoruses, and its fixed quantity equipment. This invention relates to the method of it being full automatic and making a fixed quantity the pyridino phosphoruses in body tissues, such as a bone, with high performance chromatography, including pretreatment, and its equipment among urine in more detail.

[0002]

[Description of the Prior Art] Formula at which pyridino phosphoruses (it abbreviates to HP hereafter), i.e., hydroxylidyl pyridinolin, and a RIJIRU pyridino phosphorus (it abbreviates to LP gas hereafter) manage intermolecular bridge formation of bone collagen : [0003]

[Chemical formula 1]

[0004] It comes out and is excreted by destruction of collagen accompanying bony absorption in urine from the amino acid expressed. It is known that pyridino phosphoruses exist as a separated type and a knot pattern with peptide or saccharides in urine. Osteoporosis, a chronic rheumatic arthritis, a PEJETTO disease, diabetes mellitus, hyperthyroidism, Since the collagen which forms the bone tissue by the bone disease by bone metastasis of bone tumors and cancer, a menopause, an ovarian resection, etc. is destroyed and pyridino phosphoruses are excreted by high concentration in urine, Analysis and measurement of pyridino phosphoruses capture the spotlight increasingly as these symptoms judgments and a biochemical index that the pharmacometrics in the medication of those diseases is new again.

[0005] As for the analysis method of the pyridino phosphoruses in body tissue samples including urine, high performance chromatography (it abbreviates to HPLC hereafter) is used widely. This method is EIA [Eyre, et al.), and analytical biochemistry (Anal.Biochem.), 137-volume 380 pages and the method reported by 1984]. It is the solvent which contains n-heptafluoro butanoic acid (it abbreviates to HFBA hereafter) as a mobile phase using the column filled up with the silica gel (it abbreviates to ODS hereafter) with which octadecyl silanizing of the antiphase system was carried out, and is the method of separating and detecting HP and LP gas with a fluorescence detector, respectively. Although there is also a method of using an ion exchange resin column etc. in addition to an ODS system column, though HPLC analysis is conducted using what kind of column, before pouring a sample into HPLC, the body tissue sample is pretreated.

[0006] [present / it dries under a reduced pressure of the sample which carried out hydrochloric acid treatment for measurement of the concentration of all the pyridino phosphoruses in a body tissue sample (sum total of the separated type of H.P. and each LP gas, and a knot pattern), and / with aforementioned EIA and others / analysis] It is Biogel about the sample which carried out hydrochloric acid treatment to the bone. Pyridino phosphoruses were made eluted with acetic acid 10% using P-2 column chromatography, and after-lyophilization analysis is presented with the purpose fraction. [blacks (Black et al.)] In measurement of all the pyridino phosphoruses in urine, urine and concentrated hydrochloric acid of this capacity are heated at 107 degrees C for 18 hours. By making the hydrolyzed sample stick to the column using CF1 cellulose, eluting the washing back in the mixture of 1-butanol / water / acetic acid, making a pyridino phosphorus fraction eluted with water, freeze-drying a water layer part, and remelting with a solvent How to prepare a HPLC sample is reported [analytical biochemistry (Anal.Biochem.), 169-volume 197 pages, and 1988]. furthermore, in measuring a pyridino phosphorus isolation type [in urine] [blacks which are pretreating by the method which described urine above by CF1 cellulose as it was since hydrolysis operation is unnecessary, Kalush Fayd TISSHUU International (Black et al., Calcif.Tissue Int.), 44 volumes, 343 pages, 1989 year]. Generally, the fixed quantity of pyridino phosphoruses pretreats a sample according to the method of blacks, and is performed now based on the HPLC analytical method of EIA and others.

[0007]

[Problem to be solved by the invention] However, a measurement person fills up a column with CF1 cellulose by hand, and the method of pretreating blacks urine or a body tissue sample as it is Or after carrying out hydrochloric acid treatment, charge in CF-1 column, the aforementioned solvent washes, a pyridino phosphoruses inclusion fraction is made eluted with water, and it is considered as the test sample for chemical analysis of HPLC after concentration hardening by drying. In this case, elution of pyridino phosphoruses changes with the method of restoration of CF1 cellulose, the methods of sample preparation, the balance of a solvent, etc., and since there is also no internal standard further, the recovery of a pyridino phosphorus becomes uncertain. Furthermore, lyophilization and in order to carry out concentration hardening by drying, great time is required for an eluate, and there is a factor on which measuring accuracy is dropped substantially, such as affecting the stability of pyridino phosphoruses in the meantime. In fact, it has reported that the coefficient of variation at the time of blacks hydrolyzing urine, and pretreating and analyzing is 12 to 16%, and it is inferior in analysis accuracy.

[0008] Moreover, in order to measure a lot of samples in a clinical laboratory test, economical loss --

operations, such as column restoration, column treatment, solvent distilling off, and sample pouring to HPLC, take a help and time -- is also large. For example, there are problems, like preparation of CF1 cellulose column of pretreatment and solvent distilling off will take the time of thing many size one day or more. The purpose of this invention is to offer the automatic fixed quantity method of the pyridino phosphorus which can perform quantitatively and carries out analysis column pouring automatically and which can be analyzed through a help, and its equipment on the occasion of pretreatment which separates pyridino phosphoruses from other biogenic substances in a sample, in order to cancel these troubles.

[0009]

[Means for solving problem] In order that this invention persons may attain said purpose, as a result of repeating investigation wholeheartedly, an analysis column, It uses combining the column for HPLC with which a mode differs from the analysis column as a pretreatment column. By making a pretreatment column separate pyridino phosphoruses and other biogenic substances, and pouring a pyridino phosphoruses inclusion fraction into an analysis column by column switching A separated type and a knot pattern are not asked, but it finds out that it is full automatic and the fixed quantity of pyridino phosphoruses, i.e., HP, and/or LP gas can do the total-analysis process including pretreatment by HPLC, and came to complete this invention.

[0010] Namely, in the one mode, this invention [a pyridino phosphoruses inclusion sample] This fraction is introduced into the pretreatment column with which an analysis column differs from a mode at an analysis column by column switching according to the retention time of the pyridino phosphoruses inclusion fraction in through and this pretreatment column. The automatic fixed quantity method of the pyridino phosphoruses characterized by giving high performance chromatography is offered.

[0011] Moreover, the pretreatment column for high performance chromatography with which this invention differs in the analysis column and mode for pyridino phosphoruses inclusion sample pretreatment in another mode, The change bulb which changes the pass of the eluate of a pretreatment column, and the analysis column for high performance chromatography connected with this bulb, The automatic fixed quantity equipment of the pyridino phosphoruses characterized by consisting of the detecting element which detects the eluate from this analysis column, a mobile phase supply means to each column, and an operation means to operate a change bulb is offered.

[0012] This invention is explained in detail hereafter. In the fixed quantity method of this invention, first, a pyridino phosphoruses inclusion sample is given to HPLC by a pretreatment column, and the pyridino phosphoruses inclusion fraction containing HP and LP gas is separated with other components in a sample. Do not limit the target sample in particular, and the method of this invention begins urine, can apply it to the sample of body tissue origin, such as a bone, a gear tooth, a tendon, synovial fluid, and blood, and as it is Direct Or if needed, deproteinization and an added water part understand with a conventional method, and the fixed quantity of a separated type, a knot pattern or both HP(s), and/or LP gas can be performed.

[0013] The pretreatment column to be used differs in the analysis column used behind and a mode, for example, uses pyridino phosphoruses as the column for HPLC separable in molecular sieving. That is, with this pretreatment, it is required to separate the impurity and the pyridino phosphoruses in a sample and to raise the detectability in an analysis column. for that purpose, with pretreatment, pyridino phosphoruses resemble the other components of a sample as much as possible, it dissociates, and peak width does not spread, but it becomes important not to send an unnecessary fraction into an analysis column. When the column in the same mode as an analysis column is used as a pretreatment column, the improvement in large separation with the peak by impurity cannot be expected. then, in this invention, separation modes differ paying attention to the difference in molecular weight -- for example, a molecular-sieving isolation column -- preferably A gel osmosis column (it abbreviates to GPC hereafter) and the GPC column filled up with the porous polymer system or the silica system bulking agent, especially the porous polymer bulking agent still more preferably are chosen. In order to raise

maintenance of the pyridino phosphoruses within an analysis column, the fatty acid replaced with the anion pair reagent, for example, alkyl sulfonic acid and fluorine, is used as an ion pair. Usually, a HFBA aqueous solution is used as a mobile phase of a pretreatment column, and the amount of samples, the size of a column, the rate of flow of a mobile phase, etc. are suitably chosen according to the kind of sample etc.

[0014] The eluate from a pretreatment column can usually detect pyridino phosphoruses at 297nm with an ultraviolet detecting element. In the fixed quantity method of this invention, in order to pour into an analysis column the pyridino phosphoruses inclusion fraction eluted from a pretreatment column, the column switching method according to the retention time of the pyridino phosphoruses inclusion fraction in a pretreatment column is adopted. That is, the pass change bulb controlled by the pass change bulb, for example, a timer type signal generation means etc., for example, the method bulb of six, is prepared between a pretreatment column and an analysis column, and connect time is adjusted and set up so that only a pyridino phosphoruses inclusion fraction may be poured into an analysis column. For example, a pass is changed with a signal, only the time when the pyridino phosphoruses inclusion fraction is eluted from the pretreatment column is connected with an analysis column, and it is made for the other time to flow into the waste fluid side. While the separability of a pyridino phosphorus increases by this method, deterioration by contamination of an analysis column can also be prevented.

[0015] the very thing [like the method of said EIA and others] whose fixed quantity of HP and/or LP gas using the analysis column and it in the fixed quantity method of this invention is -- it can carry out by a well-known method. Since sharpness of separation is dramatically high, the method of this invention can also use HP and LP gas which isolated from urine etc. using the method of this invention as a preparation of HP and LP gas which are used for the well-known fixed quantity method.

[0016] Furthermore, by using together the auto injector which can pour in a fixed quantity of samples in a regular interval, a sample is paid to sample tubing and the fixed quantity of a pyridino phosphorus also of a lot of samples becomes possible automatically only by sending a start signal.

[0017] For example, can enforce the fixed quantity method of this invention using the automatic fixed quantity equipment of the pyridino phosphoruses of this invention, and The pretreatment column of the above [this equipment], The change bulb which changes the pass of the eluate of a pretreatment column, for example, the method bulb of six, It consists of combination, an operation means, for example, timer type signal generation equipment, to operate a change bulb, the mobile phase supply means to each column, for example, a liquid-sending pump, the analysis column connected with this bulb, and the detecting element which detects the eluate from this analysis column, for example, a fluorescence detector, of a motor.

[0018] The flow chart of the example of the automatic fixed quantity equipment of this invention is shown in attached drawing 1 . In drawing 1 , the mobile phase of a pretreatment column and P1 express the liquid-sending pump of the mobile phase for pretreatment columns, A.I. Artificial Intelligence expresses an auto injector, and L1 expresses a pretreatment column C1. DET1 is an ultraviolet detecting element and REC is the recorder. You may not be, although used for this DET1 and REC judging the identification of elution of the pyridino phosphoruses from a pretreatment column, and the deterioration condition of a pretreatment column. V is the method bulb of six which changes a pass, and is controlled by a signal. As for an analysis column and DET2, the mobile phase of an analysis column and P2 are [integrator and R of a fluorescence detector and INT] relief bulbs the liquid-sending pump of the mobile phase for analysis columns, and C2 L2. Each [these] column, the bulb, the pump, etc. are connected with the line which consists of stainless steel tubing etc., for example.

[0019] As a mobile phase in L1, a 0.02-0.05mol HFBA aqueous solution is used, and 0.01-0.1mol usually sends the liquid preferably by 0.3-1.5ml/using the pump for liquid sending of P1 by the 0.5-1.0ml rate of flow for /. A GPC column is used as a column of C1. As this GPC column, a with an exclusion limit molecular weight of 40,000 or less porous polymer system or a silica system bulking agent, and the thing preferably filled up with 3,000 or less porous polymer system bulking agent are

used. Usually, a 100mm column is used preferably the inside diameter of 7.6mm, and 500-1000mm in length. A pyridino phosphoruses inclusion fraction is detected with the ultraviolet detecting element of DET1 at 297nm which is the absorption wavelength of pyridino phosphoruses.

[0020] V is a method bulb of six, and the pass of the eluate of a GPC column is changed with a signal, only the time when the pyridino phosphoruses inclusion fraction is eluted from the GPC column is connected with an analysis column, and it is made for the other time to flow into the waste fluid side.

[0021] The analysis column of C2 is an ODS column, the inside diameter is 4.6-10mm, and length is usually 4.6mm in inside diameter, and 150-250mm in length preferably 150-500mm. as the mobile phase in L2 -- 10 to 30% acetonitrile / 0.01-0.1mol HFBA solution -- preferably 15 to 25% acetonitrile / 0.02-0.05mol HFBA solution is used, and the liquid is usually preferably sent by 0.5-1.5ml/using the liquid-sending pump of P2 by the 0.8-1.2ml rate of flow for /. DET2 are a fluorescence detector and they detect HP and LP gas with the excitation wavelength of 295nm, and the measured wavelength of 395nm, respectively. INT is integrator and connects with a fluorescence detector. The pressure fluctuation at the time of a pass change is avoided by the relief bulb of R.

[0022] When measuring a separated type pyridino phosphorus using the method and equipment of this invention It can analyze only by being able to use liquid samples, such as urine, directly, removing the insoluble matter in a sample by centrifugal separation or filtration, putting centrifugal digestive liquor or filtrate into sample tubing of an auto injector, and putting in a start signal. A 0.03mol HFBA solution is sent by a part for 1.0ml of rates-of-flow/as a mobile phase, using a GPC column with an inside diameter of 7.6mm, and a length of 100mm for example as a pretreatment column in that case.

[0023] Since the sample is hydrolyzed with hydrochloric acid when measuring the total amount of pyridino phosphoruses in urine and a body tissue, many impurity is contained. So, strict size exclusion with pretreatment and strict separation with an analysis column are required. Centrifugal separation of the sample which carried out hydrochloric acid treatment is carried out, and supernatant liquid is put into sample tubing of an auto injector. A 0.03mol HFBA solution is sent by a part for 0.5ml of rates-of-flow/as a mobile phase, using a GPC column with an inside diameter of 7.6mm, and a length of 100mm for example as a pretreatment column. Since an analysis column needs to raise separability more, it is an ODS column with a high theoretical plate number, and sends a 0.03mol HFBA solution by a part for 1.0ml of rates-of-flow/as a mobile phase using a thing with an inside diameter of 4.6mm, and a length of 250mm.

[0024]

[Working example] Although a work example is shown below and the fixed quantity method of this invention and equipment are explained to it in more detail, this invention is not limited to this.

The bottom of a reduced pressure of 1H.P. of work examples, and 500ml of preparation rat urine of the preparation of LP gas, and after condensing to 50ml and filtering out an insoluble matter, 5ml of acetic acid is added to filtrate. Furthermore, an insoluble matter is filtered out, filtrate is given to P-Biogel 2 column chromatography (the column inside diameter of 2.5cm, and 90cm in length), and it is eluted with acetic acid 10%. It condenses under a reduced pressure of HP eluate fraction (for 200 to 300ml), and HFBA is added so that it may become 10%. This liquid is given to ODS column chromatography (column inside diameter [of 2cm], 25cm [in length], and YMC S-5 120A ODS), and it is eluted in a part for 10ml of rates-of-flow/using acetonitrile 0.03mol HFBA / 19%. LP gas peak eluted in HP peak and near 12 minute is collected and condensed. [which are eluted near for 11 minutes] Through and water are made the column (the inside diameter of 7.6mm, and 1000mm in length) filled up with GS-220 for this liquid with a mobile phase, and it is eluted in a part for 1ml of rates-of-flow/. The peaks of HP and LP gas which are eluted near for 20 minutes are collected, respectively, and if it freeze-dries, HP and LP gas of a preparation will be obtained.

[0025] The 0-10microM standard solution of the preparation HP of the calibration curve of HP and LP gas and LP gas preparation is prepared, and each standard solution is put into sample tubing for auto injectors of the equipment of drawing 1 . 25microl is poured into a GPC column (3,000 or less exclusion

limit molecular weight, the inside diameter of 7.6mm, 100mm in length, Asahipak GS-220M) through an auto injector. 0.03mol HFBA is passed by a part for 1.0ml of rates-of-flow/from P1. Just before carrying out the method bulb of six in the direction through which it flows into waste fluid in that case and eluting a pyridino phosphoruses inclusion fraction from a GPC column, Namely, a bulb is changed in 2.0 minutes after a pouring start, and immediately after it makes it connect with the analysis column side and elution [column / GPC] of a pyridino phosphoruses inclusion fraction finishes, a bulb is changed to the waste fluid side in 3.2 minutes after a pouring start. An analysis column is an ODS column ([the inside diameter of 4.6mm, 150mm in length, and particle diameter of 5 micrometers]). YMC A-302 S-5 120A Using ODS, 19% acetonitrile / 0.03mol HFBA aqueous solution is passed by a part for 1.0ml of rates-of-flow/through P2 from L2, and HP and LP gas which have been eluted from the analysis column are measured with a fluorescence detector. Thus, the acquired calibration curve is shown in drawing 2 . As shown in drawing 2 , a good straight line relation is accepted between the concentration and the peak height of each standard solution, and each correlation coefficient is 0.999 or more. Moreover, if a limit of detection sets an S/N ratio to 3, HP will serve as 0.9pmol and LP gas will serve as 1.1pmol.

[0026] 40micro of mixed standard solutions l of HP and LP gas are added to 160micro of addition recovery experiment rat urine l of HP and LP gas out of work-example 2 rat urine. This solution is filtered with a 0.45-micrometer filter, and a fixed quantity of concentration of HP and LP gas is carried out by the method indicated in the work example 1. A recovery is shown in Table 1. An average recovery is 95%. Moreover, the confidence coefficient at the time of measuring 9 times by the same concentration shows 1.5% and good reproducibility.

[0027]

[Table 1]

The result of the addition recovery from the rat urine of HP and LP gas Measured value Recovery Addition concentration nnmol/ml % nnmol/ml HP LP gas HP LP gas 0 0.28 0.08 - - 0.8 1.06 0.90 98 102.5 2.0 2.18 2.08 95 100.0 [0028] = 100micro of measurement rat urine l of the separated types HP and LP gas in work-example 3 rat urine is put into sample tubing for auto injectors. 25microl is poured into a GPC column (3,000 or less exclusion limit molecular weight, the inside diameter of 7.6mm, 100mm in length, Asahipak GS-220M) through the auto injector of the equipment of drawing 1 . A 0.03mol HFBA aqueous solution is passed by a part for 1.0ml of rates-of-flow/through P1 from L1. Just before carrying out the method bulb of six in the direction through which it flows into waste fluid in that case and eluting a pyridino phosphoruses inclusion fraction from a GPC column, Namely, a bulb is changed in 2.0 minutes after a pouring start, and immediately after it makes it connect with the analysis column side and elution [column / GPC] of a pyridino phosphoruses inclusion fraction finishes, a bulb is changed to the waste fluid side in 3.2 minutes after a pouring start. An analysis column is an ODS column ([the inside diameter of 4.6mm, 150mm in length, and particle diameter of 5 micrometers]). YMC A-302 S-5 120A HP and LP gas which passed 19% acetonitrile / 0.03mol HFBA aqueous solution by a part for 1.0ml of rates-of-flow/as a mobile phase, and have been eluted through P2 from L2 are measured with a fluorescence detector using ODS. The chromatogram at this time is shown in drawing 3 . The retention time of HP is 17 minutes and LP gas is 19 minutes.

[0029] the total in work-example 4 rat urine -- 250micro of measurement rat urine l of HP and LP gas is put into a test tube with a screw cap with concentrated hydrochloric acid of this capacity, and it heats at 108 degrees C for 18 hours. 100micro of centrifugal digestive liquor l is put into sample tubing for auto injectors of the equipment of drawing 1 after cooling. 25microl is poured into a GPC column (3,000 or less exclusion limit molecular weight, the inside diameter of 7.6mm, 100mm in length, Asahipak GS-220M) through an auto injector. A 0.03mol HFBA aqueous solution is passed by a part for 0.5ml of rates-of-flow/through P1 from L1. Just before carrying out the method bulb of six in the direction through which it flows into waste fluid in that case and eluting a pyridino phosphorus from a GPC column, Namely, a bulb is changed in 4.7 minutes after a pouring start, and immediately after it makes it

connect with the analysis column side and elution [column / GPC] of a pyridino phosphoruses inclusion fraction finishes, a bulb is changed to the waste fluid side in 5.8 minutes after a pouring start. An analysis column is an ODS column ([the inside diameter of 4.6mm, 250mm in length, and particle diameter of 5 micrometers]). YMC A-303 S-5 120A HP and LP gas which passed 19% acetonitrile / 0.03mol HFBA aqueous solution by a part for 1.0ml of rates-of-flow/as a mobile phase, and have been eluted through P2 from L2 are measured with a fluorescence detector using ODS. The retention time of HP is 27 minutes and LP gas is 31 minutes.

[0030] 294mg of measurement rat desiccation femurs of the amount of HP(s) in work-example 5 bone are heated for 18 hours at 10ml of 6N hydrochloric acid, and 110-120 degrees C. It hardens by drying under a reduced pressure after neutralization in a sodium hydroxide aqueous solution. When residue is dissolved in a mobile phase, an insoluble matter is filtered out and the amount of HP(s) is measured like the method of a work example 2, HP(s) are 111pmol / bone mg.

[0031]

[Effect of the Invention] [according to this invention / pretreatment which separates pyridino phosphoruses from other components in a sample in the fixed quantity of pyridino phosphoruses] It can carry out with precision sufficient in a short time quantitative very through a help, and it is high-precision in a little amount of samples, and the high precision automatic fixed quantity method and equipment of a pyridino phosphorus which are full automatic and can perform total-analysis processes including pretreatment are offered.
